

氏名 松 浦 香 織

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 歯 学

学位授与の番号 博 甲 第 2969 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 25 日

学位授与の要件 医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 ヒト hbd-2 による口腔バイオフィルム形成に与える影響

論文審査委員 教授 北山 滋雄 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

近年の感染症においてバイオフィルムが問題となっており、口腔内においても例外ではない。感染に対して生体には様々な防御機構が存在し、感染の初期に口腔内で産生される抗菌ペプチドの一つであるヒト hbd-2 は防御機構の一因子である。HBD-2 は、細菌の LPS や炎症性サイトカインである TNF- α などの刺激によって産生が増強されるという特徴を有するとともに、*Streptococcus mutans* (Sm) や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) などの口腔内細菌に対しても抗菌活性を有することが知られている。

これらのことから、HBD-2 を積極的に活用することが、口腔内細菌感染症に対する新しい治療法となりうるのではないかと考えた。また、合成 HBD-2 を作用させるだけでなく遺伝子導入によって、持続的に口腔内に HBD-2 を産生させることができれば、一層効果的であると考えた。そこで、本研究では口腔内感染症に対する HBD-2 の活用法を探ることを目的とした。

【材料ならびに方法】

1. 細菌：Sm 854S は、trypticsoybroth に 0.5%酵母エキスを加えた培地 (TSBY) を用い、Aa Y4 は TSBY に 0.8%NaHCO₃ を加えたものを用いて、37°C、好氣的条件下で培養した。
2. 合成型抗菌ペプチド：市販の HBD-2 (ペプチド研究所、大阪) を用いた。
3. 細胞：HeLa 細胞は、10% FCS 含有 D-MEM を用いて、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。
4. バイオフィルム成熟度の測定：Sm を TSBY + 5%ショ糖に懸濁して培養後にバイオフィルムを形成させた。成熟度は、510 nm で測定した吸光度の変化と、Sm の 16S rRNA 量の変化で表した。なお、16S rRNA 量は、TRIZOL LS Reagent[®]を用いて全 RNA を抽出後にランダムプライマーを用いて逆転写し、SYBR[®] Green を用いた定量性 RT-PCR 法で定量した。
5. Sm に対する HBD-2 の作用：バイオフィルムを形成した (6 と 24 時間) あるいは浮遊状態 (5 \times 10⁶ cfu/ml) の Sm に、HBD-2 を PBS に溶解させて (10 μ M)、0.5~2 時間作用させた。
6. 遺伝子発現用プラスミドの構築：pCMS-EGFP に *hbd-2* を組み込むことによって構築した。
7. *in vitro* 遺伝子導入法：HeLa 細胞に Lipofect AMINE および Plus reagent を加え、上述の

のプラスミド DNA を添加することによって遺伝子導入を行った。遺伝子導入効率は、顕微鏡による GFP の蛍光を観察することによって確認した。

8. *hbd-2* mRNA の定量：HeLa 細胞内の *hbd-2* mRNA の定量は、SYBR[®]Green を用いた定量性 RT-PCR 法で行った。
9. HBD-2 の定量：細胞培養上清中および細胞内の HBD-2 は、総タンパク中の HBD-2 量を合成 HBD-2 ペプチドに対する抗血清を用いた ELISA 法にて定量した。
10. Aa の細胞内侵入度の測定：*hbd-2* を導入した HeLa 細胞を Aa と共培養した後に、培養上清中および細胞表層の Aa をゲンタマイシン含有培地で殺傷した。その後、トリプシンで回収した HeLa 細胞を TSBY 寒天培地に播種し、生育してきた Aa のコロニー数を HeLa 細胞中に侵入した Aa 数とした。
11. *in vivo* 遺伝子導入法：10 週齢の雄性 Wister 系ラットを麻酔後、顎下腺を剖出し、Lipofect AMINE に上述のプラスミド DNA を混合したものを注入することによって遺伝子導入を行った。
12. ラット口腔内細菌数の測定：種々の細菌に共通するプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を SYBR[®] Green を用いたリアルタイム PCR 法にて増幅することによって、細菌数を測定した。なお、6×6 mm² の濾紙にてラットの口腔内全体を拭うことで口腔内細菌を採取し、InstaGene Matrix を用いて抽出したゲノムを用いた。
13. ラット顎下腺中の HBD-2 の定量：ラットの顎下腺を摘出後にタンパク質を抽出し、前述の方法にて総タンパク中の HBD-2 量を定量した。
14. 統計処理：Student's t-検定を用いて行った。

【結果】

1. バイオフィーム形成途中および形成後に HBD-2 を作用させても、吸光度および Sm の 16S rRNA 量に有意差はみられなかった。
3. *hbd-2* の導入によって HeLa 細胞が発現する *hbd-2* mRNA 量は有意に増加していた。なお、遺伝子導入による GFP の発現効率は約 20%であった。
4. *hbd-2* の導入によって HeLa 細胞が産生した HBD-2 量は、上清中および細胞溶解液中ともに増加傾向にあった。
5. *hbd-2* を導入した HeLa 細胞と共培養した後、細胞中へ侵入した Aa 数は有意に減少した。
6. ラットの唾液腺に *hbd-2* を導入することによって、遺伝子導入から 1 週間後の口腔内細菌量は減少した。しかし、唾液腺における HBD-2 は有意な差はみられなかった。

【考察】

HBD-2 は、バイオフィーム中の Sm 数に影響を与えることができなかった。したがって、HBD-2 の臨床応用のためには、バイオフィームが形成される前である感染の初期段階で利用することが望ましいと考える。また、Aa の上皮細胞内への侵入実験の結果から、*hbd-2* の導入によって産生された HBD-2 は上皮細胞内への Aa の侵入を抑制すると考えられる。このことから、歯周病細菌の感染初期段階で HBD-2 を作用させることで上皮細胞への侵入を阻止し、感染を防御できると考える。これは、HBD-2 の臨床への応用を考慮する際に、感染のどの段階で作用させるかという問題の答えの一つとなる。一方、*hbd-2* の導入によって *hbd-2* mRNA 量は有意に増加したが、HBD-2 量は増加傾向にとどまっていた。*hbd-2* 転写後に何らかの制御が働いている可能性を考慮する必要がある。

ラットの唾液腺に *hbd-2* を導入することによって HBD-2 を発現させたところ、口腔内細菌数が減少することがわかった。これは、口腔内における HBD-2 の有効利用の可能性を示唆するものである。

【結論】

HBD-2 は、口腔バイオフィーム形成に影響を与えることで口腔感染症の新たな治療法の手がかりとなる。

論文審査結果の要旨

近年の感染症においてバイオフィルムが問題となっており、口腔内においても例外ではない。感染に対して生体には様々な防御機構が存在し、感染の初期に口腔内で産生される抗菌ペプチドの一つであるヒト beta-defensin-2 (HBD-2) は防御機構の一因子である。HBD-2 は、細菌の LPS や炎症性サイトカインである TNF- α などの刺激によって産生が増強されるという特徴を有するとともに、*S. mutans* や *A. actinomycetemcomitans* などの口腔内細菌に対しても抗菌活性を有することが知られている。これらのことから、HBD-2 を積極的に活用することは、口腔内細菌感染症に対する新しい治療法となりうるのではないかと考えられる。そこで、本研究は口腔内感染症に対する HBD-2 の活用法を探ろうとした。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

1. 合成型 HBD-2 は、バイオフィルム中の *S. mutans* に影響を与えることができない。
2. *A. actinomycetemcomitans* の上皮細胞内への侵入実験の結果から、*hbd-2* の導入によって産生された HBD-2 は上皮細胞内への *A. actinomycetemcomitans* の侵入を抑制する。
3. ラットの唾液腺に *hbd-2* を導入することによって HBD-2 を発現させたところ、ラットの口腔内細菌数が減少する。

これらのことから、HBD-2 の臨床応用のためには、バイオフィルムが形成される前である感染の初期段階で利用することが望ましく、歯周病細菌の感染初期段階で HBD-2 を作用させることで上皮細胞への侵入を阻止し、感染の防御が可能となる考えを示唆した。また、口腔内における HBD-2 の有効利用の可能性をも示している。

よって本申請論文は、HBD-2 を感染の初期段階で作用させることが口腔感染症の新たな治療法の手がかりとなることを示唆している。

以上によって、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。